Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 555-568

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 5، آذر - دی 1399، ص. 568-555

مقاله علمی-پژوهشی

تاثیر جایگزینی آرد گندم با مشتقات پروتئینی سویا بر افزایش فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین پپتیدهای زیست فعال خمیر

رضا باتقوا[1]- معصومه مهربان سنگ آتش[2]*- احمد احتیاطی[2]

تاریخ دریافت: 1398/06/05
تاریخ پذیرش: 1398/09/18

چکیده

تحقیقات نشان داده است که برخی پپتیدهای زیست فعال با بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE)، باعث حفظ انعطاف‌پذیری دیواره رگ‌ها و جلوگیری از افزایش فشار خون می‌شوند. پروتئین سویا به‌عنوان یک منبع این‌گونه پپتیدها شناخته‌شده است. در این تحقیق، از طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل برای بررسی اثر افزودن ایزوله پروتئین سویا، پروتئین سویا اکسترود شده و هیدرولیزات پروتئین سویا در سطح‌های 5 و 10 درصد جایگزین آرد گندم و سه زمان تخمیر 30، 60 و 90 دقیقه، جهت بررسی فعالیت بازدارندگی ACE پپتیدهای جدا شده از خمیر آرد گندم استفاده شد. عصاره آبی خمیر پس از بررسی پروفایل وزن مولکولی به روش SDS-PAGE و اطمینان از حضور غلظت مناسب پپتیدهای با وزن مولکولی کم، از غشای 3 کیلو دالتون عبور داده شد و پپتیدهای زیست فعال جدا شده مورد آزمون قرار گرفت. آنالیز واریانس نتایج نشان داد که نوع پروتئین، درصد جایگزینی و زمان تخمیر با بر شدت درجه هیدرولیز و بر میزان فعالیت بازدارندگی ACE، پپتیدهای زیست فعال جدا شده از خمیر، موثر بودند ($P<0.05$). مقایسه میانگین نشان داد که خمیر حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا بیشترین درجه هیدرولیز را داشت و همچنین بیشترین میزان بازدارندگی ACE در نمونه‌های حاوی این مشتق پروتئینی مشاهده شد. ایزوله پروتئین سویا و پروتئین سویا اکسترود شده، درجه هیدرولیز متفاوت ولی درصد بازدارندگی ACE مشابهی داشتند. بر اساس نتایج حاصل‌شده، جایگزینی آرد گندم با 5 درصد از هیدرولیزات پروتئین سویا تولید گونه‌های پپتید موثر در بازدارندگی ACE در خمیر را تا حد بازدارندگی بیشتر از 83 درصد امکان‌پذیر می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم مبدل آنژیوتنسین، ایزوله پروتئین سویا، پروتئین سویا اکسترود، نان، هیدرولیزات.

مقدمه

پپتیدهای زیست فعال زیر واحدهای پروتئینی هستند که اثر مثبتی روی عملکرد بدن داشته و می‌توانند روی سلامتی اثرگذار باشند. پپتیدهای زیست فعال بر اساس توالی اسیدآمینه‌ای که دارند ممکن است سیستم‌های بدن انسان مثل قلب و عروق، دستگاه گوارش، سیستم عصبی و ایمنی را تحت تاثیر قرار دهند. اندازه توالی پپتیدهای زیست فعال از دو تا بیست اسیدآمینه متغیر است اما بعضی پپتیدها دارای زنجیره بلندی از اسیدهای آمینه می‌باشند (Singh *et al.*, 2014). پپتیدها محصول اثر هیدرولیز پروتئین‌ها با روش های آنزیمی یا اسیدی هستند. توالی و غلظت پپتیدهای زیست فعال به منبع پروتئین اولیه، آنزیم و پارامترهای فراوری مانند غلظت آنزیم و سوبسترا، pH، دما و زمان واکنش می‌باشد (Li-Chan, 2015). پپتیدهای کوتاه زنجیر متشکل از دو یا سه اسیدآمینه نسبت به اسیدهای آمینه آزاد با سرعت بیشتری در بدن جذب می‌شوند (Webb, 1990). پپتیدهای بزرگ‌تر (10-51 اسیدآمینه) موجود در رژیم غذایی نیز می‌توانند به‌صورت دست‌نخورده از طریق روده جذب شده و اثرات بیولوژیکی را باعث شوند، اگرچه کارایی پپتیدها با افزایش طول زنجیره کاهش پیدا می‌کند (Roberts *et al*., 1999).

فشار خون بالا به‌صورت افزایش در فشار خون سیستولی و دیاستولی به میزان بالاتر از سطوح نرمال تعریف می‌شود. انقباض عروق سیستمیک توسط عروق کرونر می‌تواند سبب افزایش فشار خون گردد. افزایش مداوم فشار خون، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی، خونریزی مغزی و نارسایی کلیه را افزایش می‌دهد (Ganong, 1995). افزایش فشار خون تحت تاثیر فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE[3]) اتفاق

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی کاشمر، کاشمر، ایران.
2- استادیار، گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mehraban@acecr.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i5.82680

3 Angiotensin-converting enzyme

می‌افتد. این آنزیم در سیستم رنین-آنژیوتنسین که کنترل فشار خون را بر عهده دارد، آنژیوتنسین یک را به آنژیوتنسین دو هیدرولیز می‌نماید. این سیستم با اثر بر دیواره رگ‌ها و کاهش انعطاف‌پذیری آن باعث افزاش فشار خون می‌گردد. بازدارندگی این آنزیم، باعث کاهش شدت اثر آن و کاهش فشار خون می‌گردد (Fitzgerald and Murray, 2006). داروهای سنتزی مانند آلاسپریل[1] و کپتوپریل[2] برای بازدارندگی این آنزیم و کاهش فشار خون مورداستفاده قرار گرفته است ولی این داروها اثرات جانبی مانند سرفه خشک و مشکلات پوستی به همراه دارد (Mojallal-Tabatabaei *et al*., 2014). بر این اساس، محققان به دنبال یافتن بازدارنده‌های ACE طبیعی هستند و پپتیدهای زیست فعال تولیدشده از منابع گیاهی و لبنی ازجمله راهکارهای موثر شناخته شده است (Chen *et al*., 2007; FitzGerald *et al*., 2004).

نان منبع اصلی تامین انرژی کربوهیدراتی عمده مردم دنیا است و مصرف بالایی دارد. به لحاظ تئوری، افزایش غلظت پپتیدهای زیست فعال با قابلیت بازدارندگی ACE در نان، می‌تواند در تهیه نان با ویژگی کاهش دهندگی فشار خود موثر باشد. بر این اساس، مصرف این نوع نان در بیماران دارای فشار خون مزمن و یا افراد در معرض این بیماری، می‌تواند به کنترل و درمان این بیماری کمک کند. مطالعات متنوعی در این حوزه بر پایه پروتئین‌های مختلف انجام شده است. Fitzgerald و همکاران (2014) تاثیر افزودن هیدرولیزات پروتئین *P. palmate* در سطح 4 درصد جایگزین آرد گندم را بر بازدارندگیACE نان تهیه‌شده را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که این شاخص تا 1/5 برابر افزایش یافت. Miranda و همکاران (2017) نیز مشاهده کردند که افزودن سه درصد هیدرولیزات پروتئین لوبیا به آرد گندم، قابلیت بازدارندگی ACE را هفت برابر افزایش داد. نتایج گزارش‌شده در ارتباط با افزودن سطوح 1 و 3 درصد هیدرولیزات دانه چیا به نان نیز نشان داده است که میزان بازدارندگیACE اگرچه افزایش یافت ولی پارامتر افزایش زمان هیدرولیز پروتئین ممکن است به کاهش فعالیت گونه‌های پپتیدی منجر شود (Segura-Campos *et al*., 2013). بر این اساس تعیین زمان هیدرولیز مناسب پروتئین باید مورد مطالعه قرار گیرد. طی فرایند تولید نان، طی تخمیر، آنزیم‌های با منشاء مخمر و به‌طور شدیدتر، آنزیم‌های پروتئاز موجود در آرد باعث هیدرولیز پروتئین‌ها می‌گردد (Zotta *et al*., 2006). افزایش زمان تخمیر، باعث تشدید فعالیت پروتئولیتیک و افزایش درجه هیدرولیز زنجیره‌های پروتئین می‌گردد (Thiele *et al*., 2004).

سویا منبع غنی از پروتئین‌ها است که محتوی همه اسیدهای آمینه ضروری موجود در پروتئین‌های حیوانی می‌باشد (Chatterjee *et al*., 2018). پپتیدهای زیست فعال سویا اجزای خاص پروتئین‌های اصلی سویا یعنی گلایسینین[3] و بتا کانگلایسینین[4] می‌باشند و توسط هیدرولیز آنزیمی، فراوری ماده غذایی و یا تخمیر آزاد می‌شوند. این پروتئین، به عنوان منبعی برای پپتیدهای ضد فشار خون شناخته‌شده است (Alauddin *et al*., 2015). مشاهده شده است که پپتیدهای به‌دست‌آمده از هیدرولیز قلیایی پروتئین سویا به‌طور معنی‌داری فشار خون سیستولی را در موش‌های مبتلا شده به فشار خون بالا کاهش دادند(Beermann *et al*., 2009) اخیرا 33 گونه پپتید از شیر سویای تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم که دارای بازدارندگی ACE می‌باشند شناسایی شده است (Singh and Vij, 2017). بااین‌حال در فرایندهای تخمیری، اثرگذاری آنزیم‌های ترشح شده وابسته به شرایط فرایند و ویژگی‌های پروتئین است. به دلیل وجود ساختمان نوع سوم و چهارم فشرده در پروتئین‌های با ساختار کروی، اعمال فرایند اکستروژن که اعمال هم‌زمان فشار و دمای بالا است، باعث تشکیل ساختاری لایه‌لایه در پروتئین‌های سویا می‌گردد. این عمل باعث دسترسی بهتر آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئاز می‌شود (Chen *et al*., 2011).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر نوع پروتئین شامل ایزوله پروتئین سویا، پروتئین سویا اکسترود شده و هیدرولیزات پروتئین سویا، درصد جایگزینی آرد گندم در دو سطح 5 و 10 درصد و زمان تخمیر خمیر در سه سطح 30، 60 و 90 دقیقه بر ویژگی‌های پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از 3 کیلو دالتون جدا شده از خمیر، از نظر بازدارندگیACE می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آرد گندم ستاره (رطوبت 12/5 درصد، پروتئین 11/7، جذب آب 59/8 درصد برای 500 واحد برابندر با تست فایرینوگرافی) از کارخانه آرد رضا و مخمر نانوایی *Saccharomyces cerevisiae* (خمیرمایه رضوی، مشهد) و نمک، از فروشگاه‌های محلی تهیه شد. ایزوله پروتئینی سویا (رطوبت 6/03 درصد، 63/6 درصد پروتئین) از شرکت Shandong Sinoglory Health Food CO.,LTD (چین) و هیدرولیزات پروتئین سویا (رطوبت 6/17 درصد، 81/7 درصد پروتئین) از شرکت A. Costantino & C. spa (ایتالیا) خریداری شد. ACE با منشا ریه خرگوش (A6778) و پپتید FAPGG (F7131) از شرکت Sigma-Aldrich (استرالیا) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز نیز از شرکت‌های Merck یا Sigma-Aldrich تهیه شد.

---

1 alacepril

2 Captopril

3 Glycinin

4 β-Conglycinin

اکستروژن ایزوله پروتئین سویا

برای رسیدن به شرایط حداکثر دناتوره سازی، ابتدا نمونه پس از افزودن مقدار آب لازم بر اساس رطوبت اولیه و همگن سازی، مدت 24 ساعت برای رسیدن به رطوبت 20 درصد مشروط‌سازی شد. نمونه مشروط‌سازی شده با استفاده از اکسترودر دو مارپیچ (DS32-II, Jinan Saixin Food Machinery, Shandong, P. R. China) واقع در پایلوت فراوری اکستروژن پژوهشکده علوم و فناوری غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی اکسترود شد. دمای فرایند در سه ناحیه اول، دوم و سوم به ترتیب، 50، 120 و 150 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و سرعت چرخش مارپیچ روی حداکثر تنظیم گردید. پس از یکنواخت شدن شرایط نمونه خارج‌شده از قالب، نمونه‌برداری انجام شد (Mozafarpour *et al*., 2019).

تهیه خمیر

برای تهیه نمونه شاهد، مقدار 50 گرم از آرد گندم با 30 گرم آب، 0/5 گرم مخمر و 0/5 گرم نمک به‌صورت دستی تا پخش شدن کامل پودر در آرد و یکنواخت شدن، مخلوط گردید و عملیات ورز دادن خمیر تا رسیدن به بافت یکنواخت خمیر انجام گردید. پس از تهیه خمیر، نمونه به مدت زمان‌های 30، 60 و 90 دقیقه در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد (FOC 2251, VELP SCIENTIFICA, Italy) قرار داده شد. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری نمونه برای استخراج ترکیبات پپتیدی مورد استفاده قرار گرفت (FitzGerald *et al*., 2014).

استخراج عصاره آبی خمیر

نمونه خمیر با مقدار آب 1/5 برابر وزن آن مخلوط گردید و با دستگاه همگن‌ساز[1] (Stomacher, Seward, England) یکنواخت گردید. سوسپانسیون تهیه شده به مدت 10 دقیقه با شتاب 6000×g سانتریفیوژ شد و مایع رویی جدا گردید. مایع جداسازی شده برای تبخیر الکل و دناتوره شدن پروتئین‌های حساس به حرارت، به مدت 10 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی‌گراد و همراه با هم زدن مورد تیمار قرار گرفت. نمونه حاصل‌شده، در شتاب 6000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ (2-16P, SIGMA, Germany) شد و مایع رویی از فیلتر واتمن شماره 40 عبور داده شد.

الگوی ژل الکتروفورز به روش SDS-PAGE

برای انجام جداسازی به روش الکتروفورز، ابتدا غلظت پروتئین عصاره به روش Bradford (1976) تعیین گردید. برای جداسازی فراکسیون‌های پروتئین بر اساس وزن مولکولی از روش قرار دادن در ژل SDS-PAGE بر اساس روش Laemmli (1970) استفاده شد. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز شرکت BioRad (Mini-PROTEAN Tetra System) استفاده شد. شرایط انجام آزمون، شامل غلظت ژل جدا کننده: 12 درصد، غلظت ژل متراکم کننده:4 درصد، غلظت پروتئین نمونه: 0/7 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، عامل احیاکننده 2-مرکاپتواتانول با نسبت ترکیب یک بخش پروتئین و 4 بخش بافر، پروتئین لدر 10 تا 260 کیلو دالتون و اعمال ولتاژ 120 ولت در مدت زمان 75 دقیقه بود.

جداسازی فراکسیون پپتیدی

فراکسیون پپتیدی وزن مولکولی پایین، با استفاده از جداکننده سانتریفوژی دارای غشای فیلتر وزن مولکولی 3 کیلو دالتون (VS2091, Sartorius, Germany) از نمونه اولیه عصاره جداسازی شد (Eisele *et al*., 2013).

اندازه‌گیری غلظت پپتید

اندازه‌گیری غلظت پپتیدها در محلول‌های استخراج‌شده بر اساس روش Dementiev (2012) انجام شد. برای این منظور، جذب نمونه در دو طول‌موج 215 و 225 نانومتر اندازه‌گیری شد و اختلاف جذب محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گلوتاتیون در محدوده 0 تا 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر آب دیونیزه استفاده شد.

تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز محلول‌های استخراج‌شده به روش ارائه‌شده توسط Nielsen و همکاران (2001) بر پایه واکنش OPA (o-phthaldialdehyde) و اسیدهای آمینه رشته پپتید تعیین گردید. 50 میکرولیتر از نمونه محلول پپتیدی به 1 میلی‌لیتر از معرف OPA اضافه گردید و پس از مدت زمان 2 دقیقه بلافاصله جذب محلول در طول‌موج 340 نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین از اسیدآمینه سرین به‌عنوان استاندارد استفاده شد. برای محاسبه درجه هیدرولیز از رابطه 1 استفاده شد:

$$DH = \frac{h}{h_{total}} \qquad (1)$$

که در این رابطه، h از رابطه 2 محاسبه می‌گردد. h_{total} با توجه به جدول ارائه‌شده توسط Nielsen و همکاران (2001) تعیین گردید.

$$h = \frac{(Serine-NH_2-\beta)}{\alpha} \qquad (2)$$

1 Stomacher

که در این رابطه، Serine-NH$_2$ معادل میلی اکی والان اسیدآمینه سرین نمونه مورد آنالیز است و از رابطه 3 محاسبه می‌گردد.

$$Serine-NH_2=\frac{(A_{sample}-A_{opa})}{(A_{Serine}-A_{opa})}*\frac{C_{Serine}}{C_{sample}} \quad (3)$$

که در این رابطه، A مقدار جذب، C_{serine} معادل غلظت محلول استاندارد اسیدآمینه سرین (میلی مولار) و C_{sample} معادل غلظت نمونه عصاره پپتیدی (گرم در لیتر) است.

اندازه‌گیری فعالیت بازدارندگی ACE

برای اندازه‌گیری فعالیت بازدارندگی ACE نمونه‌های عصاره پپتیدی از روش ارزیابی میزان کاهش فعالیت ACE در شکستن پپتید FAPGG به دو پپتید FAP و GG بر اساس روش ارائه‌شده توسط Tabatabaei و همکاران (2014) استفاده شد. واکنش در بافر تریس (50 میلی مولار، pH معادل 8/3، حاوی 300 میلی مولار کلرید سدیم و 10 میکرومولار کلرید روی) انجام شد. آنزیم و سوبسترا در بافر آزمایش برای رسیدن به غلظت موردنظر رقیق‌سازی شد. محیط واکنش شامل 30 میکرولیتر محلول ACE (0/1 واحد)، 65 میکرولیتر از محلول FAPGG (0/5 میلی‌مولار)، 50 میکرولیتر از محلول پپتیدی (500 و 200 میکروگرم در میلی‌لیتر) و 160 میکرولیتر بافر بود. برای نمونه شاهد، از بافر به‌جای نمونه پپتیدی استفاده شد. میزان جذب محلول واکنش پس از یک دقیقه و پس از 45 دقیقه نگهداری ظرف واکنش در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، در طول‌موج 340 نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان بازدارندگی نمونه پپتیدی با استفاده از رابطه 4 محاسبه شد.

$$ACE\ Inhibitory\ activity=\left(\frac{\Delta A_{control}-\Delta A_{sample}}{A_{control}}\right)*100 \quad (4)$$

که در این رابطه $\Delta A_{Control}$ و ΔA_{Sample} اختلاف جذب نمونه شاهد بین دقیقه‌های 1 با 45 به ترتیب برای نمونه‌های شاهد و مورد آزمایش شامل عصاره‌های فیلتر شده از خمیرهای حاصل از تیمارهای مختلف است.

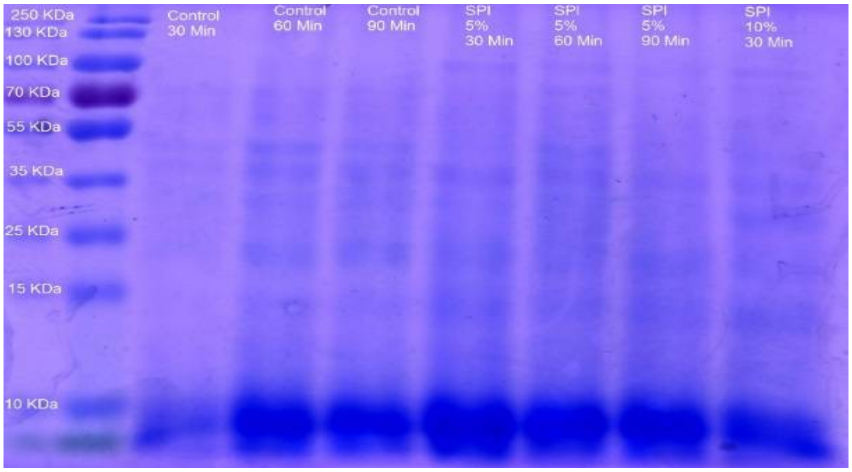
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به‌صورت کاملا تصادفی و در قالب فاکتوریل انجام شد. فاکتورها شامل نوع پروتئین در سه سطح ایزوله پروتئین سویا، پروتئین سویا اکسترود شده و هیدرولیزات پروتئین سویا، درصد جایگزینی آرد گندم در دو سطح 5 و 10 درصد و زمان تخمیر در سه سطح 30، 60 و 90 دقیقه می‌باشد. تهیه خمیر حداقل در دو تکرار و آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام گردید. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab و به روش آنالیز واریانس مدل خطی صورت گرفت و میانگین‌ها برای عوامل موثر معنی‌دار در سطح اطمینان 95 درصد با استفاده از روش محاسباتی آزمون Fisher's least square difference مورد مقایسه قرار گرفتند. رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

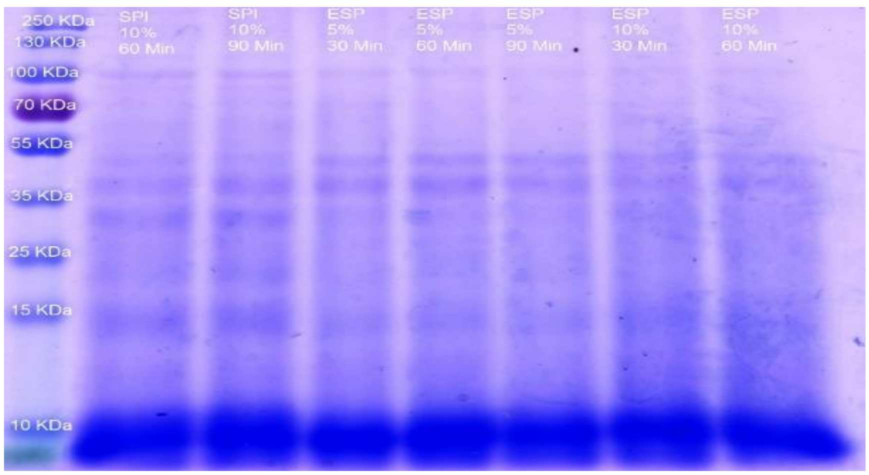
نتایج و بحث

الگوی ژل الکتروفورز

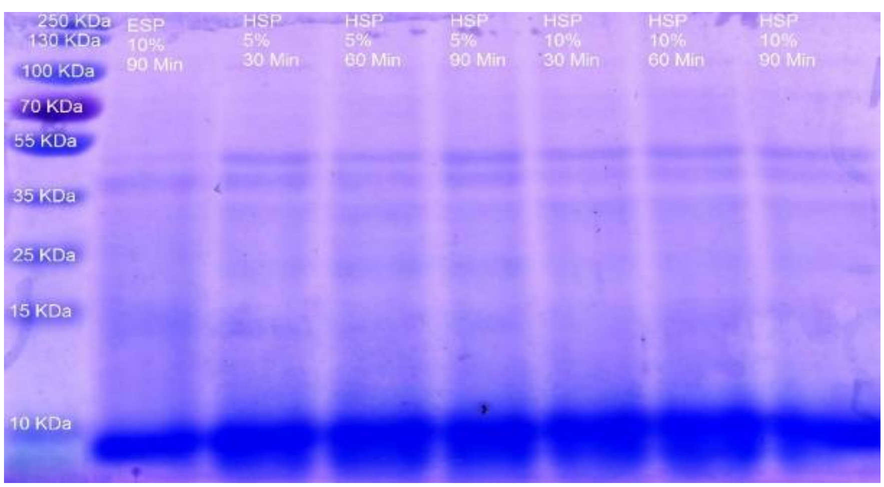
به‌منظور مقایسه شدت تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، آزمون SDS-PAGE انجام شد. تصاویر مربوط به ژل‌های به‌دست‌آمده برای عصاره‌های تهیه شده از خمیر گندم که با پروتئین‌های ایزوله سویا، ایزوله سویا اکسترود شده و هیدرولیزات پروتئین سویا جایگزین شده است، در شکل‌های 1 تا 3 ارائه گردیده است. با توجه به اینکه عصاره اولیه حرارت داده شد، به‌لحاظ تئوری پروتئین‌های سنگین و دارای ساختار در سویا و گندم دناتوره می‌شود. این اتفاق باعث کاهش حلالیت این پروتئین‌ها می‌شود یا توده‌های تجمع مولکولی سنگین و با حلالیت کم تشکیل می‌دهد. از آنجا که سانتریفوژ کردن روی نمونه‌ها در شتاب بالا اعمال گردیده است، بر این اساس، بخش عمده فراکسیون‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا رسوب کرده است (Mozafarpour *et al.*, 2019). درنتیجه، عصاره خمیر قبل از جداسازی فراکسیون 3 کیلو دالتون، حاوی پپتیدهای با وزن مولکولی‌های مختلف و عمدتا وزن کم است. پروتئین‌های این ناحیه بیشتر شامل پروتئین‌های نوع آلبومین هستند (Boye *et al.*, 2010). با مقایسه نمونه‌های خمیر حاوی پروتئین سویا با شاهد، مشاهده می‌شود که تجمع کمتری از پروتئین‌های با وزن مولکولی کمتر در نمونه‌های شاهد مشاهده می‌شود. نمونه شاهد که تنها شامل آرد گندم هست، عمدتا شامل پروتئین‌های گلوتن هست که احتمالا مقدار کمتری از این پروتئین‌ها تحت تاثیر پروتئازها تجزیه شده است و درنتیجه فراکسیون‌های با وزن مولکولی پایین را ایجاد می‌کنند (Thiele *et al.*, 2004). بااین‌حال، با توجه به اینکه فراکسیون‌های سنگین و نامحلول گلوتن طی سانتریفوژ کردن، رسوب می‌کند، درنتیجه بخش کمتری از پروتئین‌ها و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین به عصاره منتقل گردیده است. مقایسه بین سایر نمونه‌ها که حاوی مشتقات پروتئین‌های سویا هستند، نشان می‌دهد که نوارهای پروتئینی در وزن مولکولی مشابه در کلیه نمونه‌های حاوی پروتئین سویا مشاهده می‌گردد. با این‌حال تجمع پروتئینی در همه نمونه‌ها در وزن مولکولی 10 کیلودالتون و کمتر از آن مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد، درصد بالایی از عصاره، پپتیدهای با وزن مولکولی پایین هستند. همچنین هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های سویا عامل دیگر افزایش تجمع توده‌های پروتئینی در محدوده وزن مولکولی پایین محسوب می‌گردد. Peñta-Ramos و Xiong (2002) مشاهده کردند که تحت تاثیر فعالیت آنزیمی، باند مربوط به پروتئین گلایسین با افزایش زمان هضم، از بین رفته و باندهای با وزن مولکولی پایین‌تر افزایش یافت.



شکل 1- الگوی الکتروفورز SDS-PAGE نمونه‌های عصاره آبی خمیر (Control: شاهد، SPI: کنسانتره پروتئین سویا، سطر دوم، درصد جایگزینی و سطر سوم، زمان تخمیر می‌باشد)



شکل 2- الگوی الکتروفورز ژل SDS-PAGE نمونه‌های عصاره آبی خمیر(ESP: پروتئین سویا اکسترود شده)



شکل3- الگوی الکتروفورز ژل SDS-PAGE نمونه‌های عصاره آبی خمیر(HSP: هیدرولیزات پروتئین سویا)

در این نتایج مشاهده می‌شود که پروفایل وزنی عصاره، قبل از فیلتر، همان‌طور که انتظار می‌رفت، دارای غلظت بالاتری از پپتیدهای با وزن مولکولی کم در مقایسه با پروتئین‌های سنگین وزن است. با مقایسه کلی نمونه‌ها، به‌نظر می‌رسد، نمونه‌های حاوی پروتئین سویا اکسترود شده، دارای مقدار بیشتری از پپتیدهای با وزن مولکولی پایین باشد. این پدیده احتمالا ناشی از اعمال فرایند اکستروژن باشد که باعث گردیده است بخش بیشتری از زنجیره‌های پروتئینی دچار شکستن شده باشد. درصد جایگزینی‌های مختلف و همچنین افزایش زمان تخمیر، تفاوت قابل‌توجهی در الگوی الکتروفورز نشان نمی‌دهد.

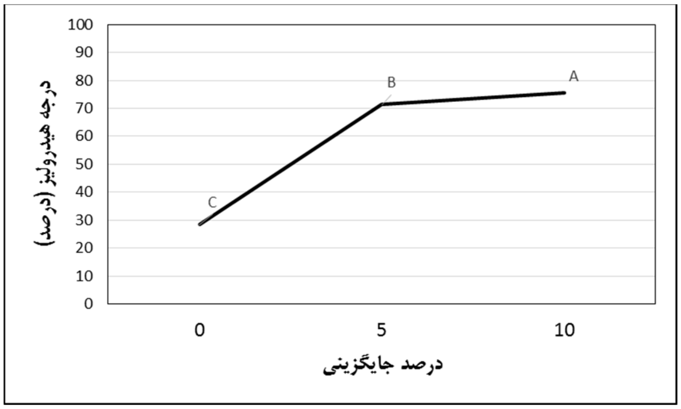
درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز شاخصی از میزان شکسته شدن زنجیره‌های پروتئینی و در واقع شاخصی از طول زنجیره‌های پپتیدی در عصاره فیلتر شده خمیر است. هرچه درجه هیدرولیز بالاتر باشد، انتظار می‌رود که زنجیره‌های پپتیدی کوتاه‌تری در عصاره موجود باشد. آنالیز واریانس اثر مستقل و برهمکنش متغیرهای مورد بررسی نشان داد که نوع پروتئین، درصد جایگزینی آرد گندم و زمان تخمیر، به‌طور معنی‌داری بر تغییرات درجه هیدرولیز موثر بود ($P<0.001$). همچنین برهمکنش دوگانه و سه‌گانه متغیرها نیز اثر معنی‌داری بر درجه هیدرولیز داشت ($P<0.001$). به‌طورکلی، عصاره‌های تهیه شده از خمیر حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا، دارای درجه هیدرولیز بالاتری در مقایسه با نمونه‌های حاوی ایزوله پروتئین سویا و پروتئین سویا اکسترود شده بود (شکل 4). این مسئله با توجه به اینکه هیدرولیزات در مقایسه با دو پروتئین دیگر یک مرحله تجزیه آنزیمی را به همراه داشته است، انتظار می‌رود دارای زنجیره‌های پپتیدی کوتاه‌تری باشد که در مرحله بعد نیز در اثر پروتئولیز طی تخمیر بیشتر هیدرولیز شده است. استفاده از آنزیم‌های تجاری در فرایند هیدرولیز پروتئین، تنوع گونه‌های پپتید و تعداد پپتیدهای کوچک را در مقایسه با فرایندهای تخمیری منجر به هیدرولیز پروتئین افزایش می‌دهد (Peñas *et al.*, 2015). بر این اساس، انتظار می‌رود نمونه‌های حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا، از درجه هیدرولیز بالاتری برخوردار باشد. پروتئین سویا اکسترود شده، درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به ایزوله پروتئین سویا نشان داد که احتمالا این پدیده مرتبط با باز شدن زنجیره پروتئین، تغییر خصوصیات سطحی و شکسته شدن و در بیشتر در معرض هیدرولیز آنزیمی قرار گرفتن است (Surówka *et al.*, 2004).



شکل 4- تاثیر نوع پروتئین بر درجه هیدرولیز عصاره پپتیدی خمیر

بررسی نمودار تغییرات درجه هیدرولیز عصاره با افزایش درصد جایگزینی آرد گندم با مشتقات پروتئینی سویا (شکل 5)، نشان می‌دهد که در سطح 5 درصد جایگزینی، در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش معنی‌داری در درجه هیدرولیز مشاهده می‌شود. بااین‌حال، افزایش درصد جایگزینی آرد گندم، اگرچه درجه هیدرولیز را افزایش داده است ولی معنی‌دار نبود. با توجه به اینکه مقدار پروتئین‌های محلول در مشتقات سویا بیشتر از گندم است (Zayas, 1997). این مسئله باعث می‌گردد که محتوای پروتئین بیشتری به عصاره فیلتر شده منتقل گردد که عمدتا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر هستند به همین دلیل در مقایسه با نمونه شاهد، حجم بیشتری از مولکول‌های با وزن مولکولی پایین‌تر در عصاره این نمونه‌ها مشاهده می‌گردد که درنتیجه درجه هیدرولیز عصاره نیز افزایش می‌یابد. یکی از عوامل تهییج‌کننده رشد مخمر و در نتیجه افزایش فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با این پدیده، حضور پروتئین‌هایی است که بر رشد مخمر موثر هستند. Liu و همکاران (2016) تاثیر افزودن هیدرولیزات پروتئین سویا را بر رشد مخمر نان مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که تحت شرایط کشت، رشد مخمر در حضور هیدرولیزات پروتئین سویا تا ده برابر افزایش یافت. بر این اساس، احتمالا افزایش محتوای پروتئین، در افزایش فعالیت آنزیمی و به دنبال آن، افزایش هیدرولیز موثر باشد.



شکل 5- تاثیر درصد جایگزینی آرد گندم با مشتقات پروتئین بر درجه هیدرولیز عصاره پپتیدی خمیر

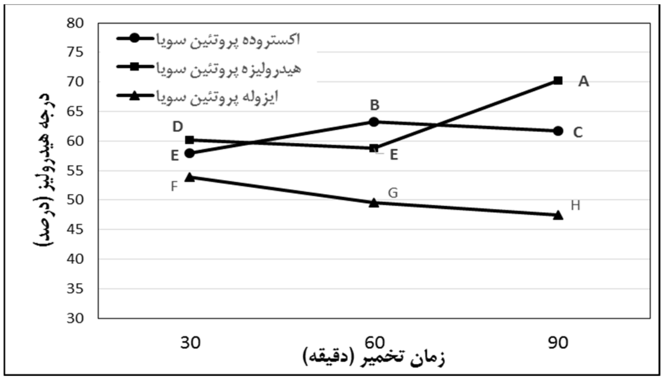
بررسی نتایج نشان می‌دهد که افزایش زمان تخمیر به طور معنی‌داری باعث افزایش درجه هیدرولیز عصاره گردید (شکل 6). افزایش زمان تخمیر به دلیل افزایش مدت زمان فعالیت مخمر و درنتیجه افزایش مدت زمان در دسترس جهت اثرگذاری آنزیم، باعث می‌شود که زنجیره پپتیدی بیشتری طی تخمیر هیدرولیز شود (Thiele *et al*., 2004). Jakubczyk و همکاران (2013) از سویه‌ای از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای تخمیر پروتئین نخود و سپس هضم آنزیمی شرایط معده و روده به‌منظور تولید پپتیدهای هیدرولیزات بهره بردند. نتایج این محققان نشان داد که تخمیر اولیه، شدت هیدرولیز را افزایش داد. Peñas و همکاران (2015) از سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*[1] ایزوله شده از پنیر اسپانیایی برای تولید خمیرترش، به‌منظور تولید نان کاهنده فشار خون استفاده کردند. مشاهده شد که تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از 3 کیلو دالتون، در حضور سویه باکتریایی تا 15 برابر افزایش یافت که نشان‌دهنده اثرگذاری شدت تخمیر بر تجزیه آنزیمی و تولید رشته‌های کوتاه‌تر پپتیدی است.نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است (Bhaskar *et al*., 2007; Kong and Xiong, 2006).

نوع پروتئین بر تغییرات درجه هیدرولیز طی زمان معنی‌دار بود. تغییرات این پاسخ در برابر این دو متغیر در شکل 7 ارایه شده است. مشاهده می‌شود که در دو مشتق پروتئینی اکستروده پروتئین سویا و هیدرولیزات پروتئین سویا، با افزایش زمان تخمیر، افزایش درجه هیدرولیز مشاهده می‌شود ولی در ارتباط با ایزوله پروتئین سویا، این تغییرات کاهشی است. این مسئله احتمالا مرتبط نحوه اثر پروتئازهای موجود در خمیر بر این پروتئین‌ها و همچنین وضعیت اسیدهای آمینه آزاد و طول رشته پپتیدی در این سه مشتق پروتئینی باشد. احتمالا در ایزوله پروتئین سویا، فعالیت هیدرولیز بر رشته‌های پپتیدی تاثیر کمی داشته یا رشته‌های پپتیدی ایجاد شده، دارای طول زیاد بوده که امکان عبور از فیلتر 3 کیلو دالتون را نداشته است. به‌طورکلی برای افزایش تنوع ترکیبات پپتیدی با طول کم، اکستروده و هیدرولیزات پروتئین سویا،ن گزینه‌های بهتری در مقایسه با ایزوله پروتئین سویا هستند.



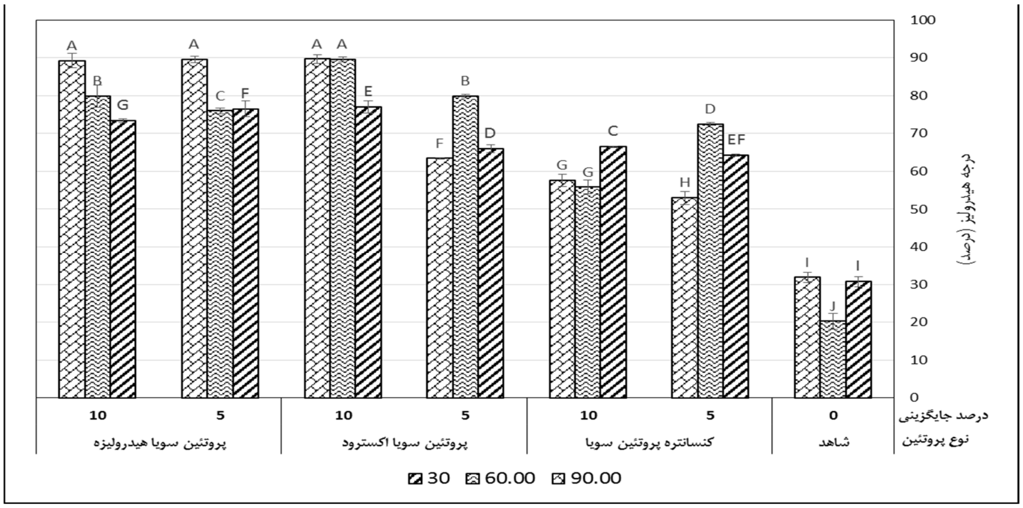
شکل 6- تاثیر زمان تخمیر بر درجه هیدرولیز عصاره پپتیدی خمیر

1 *Lactobacillus brevis*



شکل 7- تاثیر نوع پروتئین و زمان تخمیر بر درجه هیدرولیز عصاره پپتیدی خمیر

کمترین درجه هیدرولیز عصاره‌ها مربوط به نمونه‌های شاهد بود درحالی‌که بالاترین درجه هیدرولیز مربوط به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا با زمان تخمیر 90 دقیقه است (شکل 8). درنتیجه، به نظر می‌رسد افزایش زمان تخمیر، شدت هیدرولیز پروتئین‌ها را افزایش داده است و منجر به تولید رشته‌های پپتیدی با طول کمتر شده است. همچنین نمونه حاوی پروتئین سویا اکسترود شده، در سطح 10 درصد جایگزینی نیز، بالاترین درجه هیدرولیز یعنی در حدود 90 درصد را نشان داد. نمونه‌های حاوی ایزوله پروتئین سویا در مقایسه با پروتئین سویا اکسترود شده و هیدرولیزات، درجه کمتری از هیدرولیز را نشان داد، اگرچه مقادیر حاصل بیشتر از نمونه شاهد بود. می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که پروتئین سویا طبیعی به دلیل ساختار مستحکم‌تری که در مقایسه با دو مشتق دیگر، در مقابل هیدرولیز مقاوم‌تر بوده است و افزایش درجه جانشینی و حتی افزایش زمان تخمیر، تاثیر قابل‌توجهی بر افزایش شدت هیدرولیز نداشته است.



شکل 8- مقایسه اثر نوع پروتئین و میزان جایگزینی آرد گندم بر درجه هیدرولیز عصاره پپتیدی خمیر

فعالیت بازدارندگی ACE

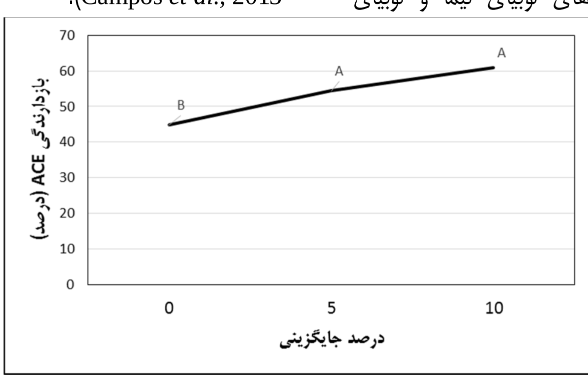
فعالیت بازدارندگی ACE برای نمونه‌های مختلف عصاره خمیر در دو غلظت 250 و 500 µg/ml در جدول 1 ارائه‌شده است. همچنین در این جدول مقدار IC_{50} برای نمونه‌هایی که غلظت IC_{50} در محدوده 250 تا 500 میکروگرم در میلی‌لیتر است، محاسبه و ارایه شده است. داده‌های به‌دست‌آمده، در محدوده نتایج گزارش شده در مطالعه Boschin و همکاران (2014)، برای هیدرولیزات پروتئین حبوبات (با استفاده از آنزیم پپسین)، بین 224 میکروگرم در میلی‌لیتر برای سویا با بیشترین بازدارندگی و 673 میکروگرم در میلی‌لیتر برای نخود با کمترین فعالیت است. آنالیز واریانس، نشان داد که نوع پروتئین و درصد جایگزینی در هر دو غلظت مورد بررسی بر بازدارندگیACE تاثیر گذار بودند ($P<0.001$) ولی در مورد زمان تخمیر، اگرچه در غلظت µg/ml 500 با ولی در غلظت کمتر (250 µg/ml) ، تاثیرگذاری مشاهده نشد. همچنین برهمکنش درصد جایگزینی و زمان تخمیر به‌طور معنی‌داری بر شدت بازدارندگی ACE تاثیر گذار بود (جدول ارایه نشده است). مقایسه میانگین میزان بازدارندگی ACE برای پروتئین‌های مختلف

جایگزین آرد گندم در فرمولاسیون خمیر، در غلظت پپتید 500 µg/ml در شکل 9 ارائه‌شده است. به‌طورکلی بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا است. با توجه به اینکه بیشترین میزان هیدرولیز مربوط به هیدرولیزات پروتئین سویا است (شکل 4). انتظار می‌رود، هیدرولیز بیشتر، تنوع گونه‌های پپتید را افزایش داده و طول زنجیره‌های پروتئینی را کاهش می‌دهد، در نتیجه باعث گردیده است که خمیر حاوی این مشتق، تنوع پپتید با بازدارندگی بیشتر داشته باشد. از طرف دیگر، تفاوت معنی‌داری بین دو مشتق پروتئینی دیگر، شامل ایزوله پروتئین سویا و پروتئین سویا اکسترود شده مشاهده نشد. Chiang و همکاران (2006) بیان کردند که بازدارندگی ACE در ایزوله پروتئین سویا به دلیل مقدار و تنوع کم پپتیدهای با طول زنجیره کوتاه، ناچیز است و اعمال فرایند هیدرولیز آنزیمی برای آزادسازی گونه‌های متنوع پپتیدی لازم است، به‌طوری‌که با افزایش شدت هیدرولیز، میزان بازدارندگی ACE افزایش می‌یابد. بر این اساس، چون تنها هیدرولیز تحت تاثیر آنزیم‌های خمیر روی این پروتئین‌ها، انجام شده است، زنجیره پپتیدی با توالی موثر بر ACE کمتر تولیدشده‌اند. با توجه به اینکه ساختار پروتئینی این دو مشتق مشابه هستند، نتایج مشابهی برای ایزوله پروتئین سویا و اکسترود شده پروتئین سویا مشاهده می‌شود. Fitzgerald و همکاران (2014) با افزودن هیدرولیزات (با استفاده از آنزیم پاپائین) جلبک *Palmaria palmate* به آرد گندم در سطح 4 درصد، مشاهده کردند که بازدارندگی مکانیسم رنین از 5 درصد به 15 درصد افزایش یافت. به‌طورکلی، مشتقات هیدرولیزات، به دلیل تنوع پپتیدی بالاتر، دارای فعالیت زیستی بیشتر در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی با طول زنجیره بالا هستند.



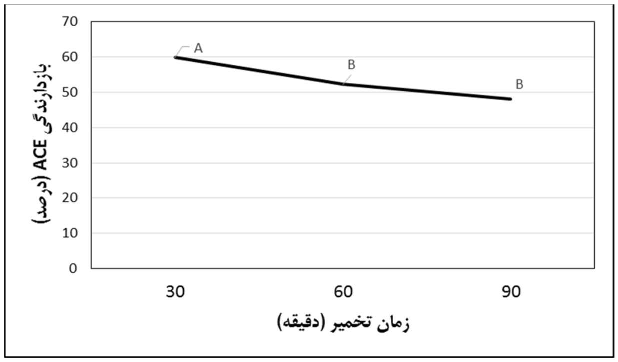
شکل 9 - اثر نوع پروتئین بر بازدارندگی ACE عصاره پپتیدی خمیر در غلظت 500µg/ml

جایگزینی آرد گندم با مشتقات پروتئین سویا باعث افزایش میزان بازدارندگی ACE عصاره گردید (شکل 10) ولی با افزایش بیشتر سطح جایگزینی تا 10 درصد، اگرچه افزایش بازدارندگی مشاهده شد ولی این میزان افزایش معنی‌دار نبود. این مسئله احتمالا به این دلیل هست که طی تخمیر، با حضور پروتئین‌هایی متفاوت با پروتئین‌های گندم، گونه‌های پپتیدی جدیدی ایجادشده است که بازدارندگی بالاتری در مقایسه با پپتیدهای تولیدشده از پروتئین گندم دارد. Miranda و همکاران (2017) هیدرولیزات پروتئین‌های لوبیای لیما و لوبیای چشم‌بلبلی را جانشین آرد گندم کردند و بازدارندگی عصاره تهیه شده از نان آرد مخلوط را مورد بررسی قرار دادند. در سطح 1 درصد جانشینی، در مقایسه با نمونه کنترل افزایش قابل‌توجهی در میزان بازدارندگی ACE مشاهده شد ولی با افزایش درصد جانشینی به 3 درصد، اگرچه میزان بازدارندگی ACE افزایش یافت ولی این میزان افزایش معنی‌دار نبود. نتایج مشابهی توسط محققان دیگر در ارتباط با سطوح افزودن هیدرولیزات دانه چیا (1 تا 3 درصد) در نان گزارش شده است (Segura-Campos *et al*., 2013).



شکل 10- تاثیر درصد جایگزینی بر بازدارندگی ACE عصاره پپتیدی خمیر در غلظت 500µg/ml

افزایش زمان تخمیر از 30 به 60 دقیقه، بازدارندگی ACE را کاهش داد ولی افزایش زمان تخمیر به 90 دقیقه اثر معنی‌داری نداشت (شکل 11). به‌نظر می‌رسد، افزایش زمان تخمیر که با توسعه فعالیت آنزیم همراه هست، با تجزیه پپتیدهای تولیدشده موجود، منجر به تولید گونه‌های پپتیدی شده است که فعالیت بازدارندگی کمتری در مقایسه با پپتیدهای اولیه شده است. Rho و همکاران (2009) مشاهده کردند که افزایش زمان تخمیر، بیشتر از حد بهینه، تاثیری بر میزان بازدارندگیACE مخلوط آرد گندم و سویا نداشت. Nielsen و همکاران (2009) نیز افزایش بازدارندگی ACE و سپس کاهش آن با افزایش زمان تخمیر شیر را طی استفاده از سویه‌های مختلف اسید لاکتیک باکتری گزارش کردند. بااین‌حال، نتایج Zhang و همکاران (2006) در تضاد با نتایج سایر محققین بیان کردند که افزایش زمان تخمیر محصول داچی بر پایه سویا، افزایش فعالیت پپتیدهای بازدارنده ACE را به همراه داشت. باید این مسئله در نظر گرفته شود که تفاوت در شرایط تخمیر، به‌ویژه مدت زمان تخمیر و همچنین روش‌های خالص‌سازی یا فراکسیونه کردن بر نتایج تاثیر گذار هستند.

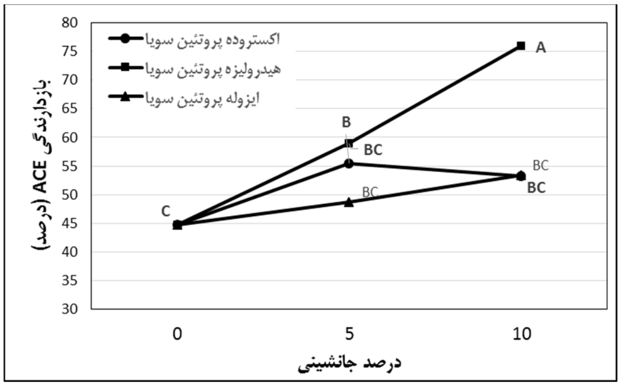


شکل 11- تاثیر زمان تخمیر بر بازدارندگی ACE عصاره پپتیدی خمیر در غلظت 500µg/ml

تغییرات بازدارندگی ACE برای پروتئین‌های مختلف با افزایش درجه جانشینی آرد گندم در شکل 12 ارایه شده است. همان‌طور که بیان شد، جانشینی آرد گندم با مشتقات پروتئینی سویا، افزایش فعالیت بازدارندگی ACE را به همراه داشت ولی میزان این افزایش در مورد ایزوله و اکستروده پروتئین سویا معنی‌دار نبود. بااین‌حال، در مورد هیدرولیزات پروتئین سویا، افزایش درصد جانشینی، افزایش بازدارندگی را به همراه دارد. این مسئله احتمالا ناشی از افزایش هیدرولیز طی تخمیر و افزایش تنوع پپتیدها است.

مقایسه تیمارهای مختلف در جدول 1 ارائه‌شده است. بر اساس این نتایج، بیشترین مقادیر بازدارندگی ACE مربوط به هیدرولیزات پروتئین سویا در سطح جایگزینی 10 درصد است. بااین‌حال نمونه شاهد با 30 دقیقه تخمیر نیز میزان بازدارندگی بالایی را نشان داد. به‌طورکلی، با توجه به اینکه تنوع گونه‌های پپتیدی طی پروتئولیز با زمان تغییر می‌کند، الگوی مشخصی برای جهت‌دهی فرایند به سمت تولید پپتیدهای خاص وجود ندارد. شاخص IC50 مقایسه مناسب‌تری بین تیمارهای مختلف مورد بررسی ارایه می‌دهد (جدول 1). جایگزینی آرد گندم با هیدرولیزات پروتئین سویا در سطح 10 درصد جایگزینی، منجر به تولید پپتیدهایی گردید که به دلیل بالاتر بودن درصد بازدارندگی از عدد 50 در غلظت 250 میکروگرم در میلی‌لیتر، امکان محاسبه IC_{50} وجود نداشت. این مسئله نشان می‌دهد که در بین نمونه‌های مورد بررسی، بیشترین بازدارندگی مربوط به نمونه حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا است. در بین نمونه‌هایی که مقادیر IC_{50} قابل‌محاسبه بود، نمونه حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا، در سطح جانشینی 5 درصد و زمان تخمیر 90 دقیقه، کمترین میزان IC_{50} را داشت که این مسئله با بحث مطرح شده در مورد اثر زمان تخمیر مورد انتظار هست.

به‌طورکلی با مقایسه مقادیر مختلف می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیشترین بازدارندگی مربوط به نمونه‌های حاوی هیدرولیزات پروتئین سویا است. بااین‌حال، این مسئله باید در نظر گرفته شود که با اثرگذاری آنزیم‌های گوارشی بر رشته‌های پپتیدی در بدن و تولید پپتیدهای جدید با طول رشته کمتر، انتظار می‌رود، گونه‌های جدیدی از پپتید ایجاد گردد که دارای فعالیت شدیدتری در بازدارندگی ACE داشته باشند. در این رابطه، Zhang و همکاران (2006) مشاهده کردند که هیدرولیز آنزیمی عصاره تهیه شده از محصول سویای تخمیری با آنزیم‌های گوارشی، باعث کاهش IC_{50} از 5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به 160 میکروگرم در میلی‌لیتر گردید. همچنین، عموما، پپتیدهای موجود در مواد غذایی، دارای بازدارندگی متفاوتی هستند و میزان بازدارندگی عصاره، برآیندی از گونه‌های پپتیدی است. در مطالعه Shin و همکاران (2001)، مقدار IC_{50} برای عصاره استخراج‌شده از محصول تخمیری بر پایه سویا، 276 میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد ولی با خالص‌سازی عصاره به روش HPLC، رشته پپتیدی جداسازی شد که دارای IC_{50} معادل 2/2 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بر این اساس، این احتمال وجود دارد که در هر یک از نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق، گونه‌های پپتیدی با فعالیت شدید بازدارندگی ACE موجود باشد که نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد.



شکل 12- تاثیر نوع پروتئین و درصد جانشینی بر بازدارندگی ACE عصاره پپتیدی خمیر در غلظت 500µg/ml

جدول 1- درصد بازدارندگی ACE در غلظت‌های مختلف و مقدار غلظت IC_{50} برای عصاره‌های مختلف

نوع پروتئین	درصد جایگزینی	زمان تخمیر (دقیقه) ۳۰			۶۰			۹۰		
		۲۵۰ µg/ml	۵۰۰ µg/ml	IC_{50} µg/ml	۲۵۰ µg/ml	۵۰۰ µg/ml	IC_{50} µg/ml	۲۵۰ µg/ml	۵۰۰ µg/ml	IC_{50} µg/ml
شاهد		۳۸/۷۵±۲/۷	۶۷/۵±۳/۱	۳۴۷/۸	۱۱/۶±۱۰/۲	۳۳/۶±۱۱/۳	nc	۲۲/۲±۱۰/۲	۳۳/۳±۶/۹	nc-L
ایزوله	۵	۱۴/۱±۱۸/۱	۲۹/۲±۴/۶	nc-L	۲۴/۹±۵/۸	۵۰/۳±۱۷/۲	۴۹۶/۹	۲۰/۸±۱۰/۴	۶۶/۹±۱۱/۵	۴۰۸/۵
پروتئین سویا	۱۰	۴۸/۶±۷/۸	۶۳/۶±۲/۴	۲۷۲/۹	۳۷/۵±۱۰/۶	۴۴/۸±۱۴/۳	nc-L	۴۵/۹±۳/۷	۵۱/۷±۲/۶	۴۲۶/۶
پروتئین	۵	۳۰/۹±۲۱/۷	۶۳/۶±۱۲/۸	۳۹۵/۳	۱۸/۳±۱۱/۳	۶۳/۶±۱/۵	۴۲۵	۳۴/۷±۹/۳	۳۹/۱±۱۱/۵	nc-L
سویا اکسترود	۱۰	۱۶/۶±۱۱/۹	۴۸/۶±۱۱/۳	nc-L	۳۷/۲±۸/۶	۵۷/۹±۶/۱	۴۰۴/۷	۴۶/۶±۴/۹	۵۳/۱±۱۱/۵	۳۸۰/۹
هیدرولیزات	۵	۳۰/۶±۸/۸	۴۹/۵±۱۱/۲	nc-L	۶۰/۶±۵/۳	۶۵/۸±۱۰/۴	nc-H	۴۹/۶±۴/۹	۵۸/۶±۱۸/۳	۲۶۰/۵
پروتئین سویا	۱۰	۷۳/۶±۲/۳	۸۰/۶±۳/۸	nc-H	۶۸/۴±۱۰/۲	۸۳/۶±۵/۹	nc-H	۴۲/۸±۱۱/۹	۶۳/۵±۴/۱	۳۳۶/۹

nc-L: به دلیل پایین‌تر بودن مقادیر بازدارندگی ACE از 50 درصد در هر دو غلظت، محاسبه نشده است؛ nc-H: به دلیل بالاتر بودن مقادیر بازدارندگی ACE از 50 درصد در هر دو غلظت، محاسبه نشده است.

نتیجه‌گیری

افزودن مشتقات پروتئینی سویا به‌ویژه هیدرولیزات پروتئین سویا، باعث افزایش محتوای پپتیدی خمیر آرد گندم می‌شود و تنوع گونه‌های پپتیدی تشکیل شده طی تخمیر را افزایش می‌دهد. این مسئله افزایش درجه هیدرولیز و همچنین افزایش بازدارندگیACE در خمیر را افزایش داد که می‌تواند به‌منظور فرمولاسیون نان کاهنده فشار خون مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، افزایش سطح جایگزینی آرد گندم تاثیر معنی‌داری بر افزایش بازدارندگیACE نداشت و در سطوح پایین هم افزایش بازدارندگی قابل مشاهده است. افزایش زمان تخمیر، اگرچه درجه هیدرولیز را افزایش می‌دهد، ولی به‌طورکلی کاهش بازدارندگیACE را به همراه دارد. با نگاه به شرایط تکنولوژیکی و همچنین شدت اثر گذاری غلظت در تولید پپتیدهای زیست فعال بازدارنده ACE، فرمولاسیون جایگزینی پنج درصد آرد گندم با هیدرولیزات پروتئین سویا و مدت زمان تخمیر 30 دقیقه بر اساس نتایج این تحقیق برای تولید نان حاوی ترکیبات زیست فعال بازدارنده ACE پیشنهاد می‌شود. این نتیجه بایستی به لحاظ تکنیکی تولید و کیفیت نان مورد بررسی قرار گرفته و سپس در مرحله دوم، با آزمون‌های بالینی میزان اثر گذاری آن در کاهش فشار خون مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

Alauddin, M., Shirakawa, H., Hiwatashi, K., Shimakage, A., Takahashi, S., Shinbo, M., Komai, M., 2015. Processed soymilk effectively ameliorates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods* 14, 126–132.

Beermann, C., Euler, M., Herzberg, J., Stahl, B., 2009. Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from

soybean protein isolate. *Eur. food Res. Technol.* 229, 637–644.

Bhaskar, N., Sakhare, P.Z., Suresh, P. V, Gowda, L.R., Mahendrakar, N.S., 2007. Biostabilization and preparation of protein hydrolysates from delimed leather fleshings.

Boschin, G., Scigliuolo, G.M., Resta, D., Arnoldi, A., 2014. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. Food Chem. 145, 34–40.

Boye, J.I., Roufik, S., Pesta, N., Barbana, C., 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 987–991.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. Chatterjee, C., Gleddie, S., Xiao, C.-W., 2018. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients* 10, 1211. https://doi.org/10.3390/nu10091211

Chen, G.-W., Tsai, J.-S., Sun Pan, B., 2007. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *Int. Dairy* J. 17, 641–647.

Chen, L., Chen, J., Ren, J., Zhao, M., 2011. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll*. 25, 887–897.

Chiang, W.-D., Tsou, M.-J., Tsai, Z.-Y., Tsai, T.-C., 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chem.* 98, 725–732.

Dementiev, A., 2012. K-Ras4B lipoprotein synthesis: Biochemical characterization, functional properties, and dimer formation. Protein Expr. *Purif.* 84, 86–93.

Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., & Fischer, L., 2013. Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using Bacillus lentus alkaline peptidase. *European Food Research and Technology*, 236, 483-490.

Fitzgerald, C., Gallagher, E., Doran, L., Auty, M., Prieto, J., Hayes, M., 2014. Increasing the health benefits of bread: Assessment of the physical and sensory qualities of bread formulated using a renin inhibitory Palmaria palmata protein hydrolysate. *LWT - Food Sci. Technol*. 56, 398–405.

Fitzgerald, R.J., Murray, B.A., 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *Int. J. Dairy Technol*. 59, 118–125.

Fitzgerald, R.J., Murray, B.A., Walsh, D.J., 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134, 980S-988S.

Franco-Miranda, H., Chel-Guerrero, L., Gallegos-Tintoré, S., Castellanos-Ruelas, A., Betancur-Ancona, D., 2017. Physicochemical, rheological, bioactive and consumer acceptance analyses of concha-type Mexican sweet bread containing Lima bean or cowpea hydrolysates. *LWT* 80, 250–256.

Ganong, W.F., 1995. Reproduction and the renin-angiotensin system. Neurosci. *Biobehav*. Rev. 19, 241–250.

Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., Pietrzak, M., 2013. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* 141, 3774–3780.

Kong, B., Xiong, Y.L., 2006. Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action. *J. Agric. Food Chem*. 54, 6059–6068.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

Li-Chan, E.C.Y., 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. Curr. Opin. *Food Sci.* 1, 28–37.

Liu, X., Li, T., Liu, B., Zhao, H., Zhou, F., Zhang, B., 2016. An External Addition of Soy Protein Isolate Hydrolysate to Sourdough as a New Strategy to Improve the Quality of Chinese Steamed Bread. *J. Food Qual*. 39, 3–12.

Mojallal-Tabatabaei, Z., Asoodeh, A., Asadi, F., Nezafati, H.R., 2014. ACE-Inhibitory and Antioxidant Activity of Temporin-Ra Peptide: Biochemical Characterization and Molecular Modeling Study. Int. J. Pept. Res. Ther. 20, 493–500.

Mozafarpour, R., Koocheki, A., Milani, E., Varidi, M., 2019. Extruded soy protein as a novel emulsifier: Structure, interfacial activity and emulsifying property. *Food Hydrocoll*. 93, 361–373.

Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I., Otte, J., 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* 19, 155–165.

Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J. Food Sci*. 66, 642–646.

Peñas, E., Diana, M., Frias, J., Quílez, J., Martínez-Villaluenga, C., 2015. A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction. Plant Foods Hum. *Nutr.* 70, 97–103.

Peñta-Ramos, E.A., Xiong, Y.L., 2002. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J. Food Sci*. 67, 2952–2956.

Rho, S.J., Lee, J.-S., Chung, Y. Il, Kim, Y.-W., Lee, H.G., 2009. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem*. 44, 490–493.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P., 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 60, 332–337.

Segura-Campos, M.R., Salazar-Vega, I.M., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A., 2013. Biological potential of chia (Salvia hispanica L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Sci. Technol*.

50, 723–731.

Shin, Z.-I., Yu, R., Park, S.-A., Chung, D.K., Ahn, C.-W., Nam, H.-S., Kim, K.-S., Lee, H.J., 2001. His-His-Leu, an Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Korean Soybean Paste, Exerts Antihypertensive Activity in Vivo. J. Agric. *Food Chem*. 49, 3004–3009.

Singh, B.P., Vij, S., 2017. Growth and bioactive peptides production potential of Lactobacillus plantarum strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality. *LWT* 86, 293–301.

Singh, B.P., Vij, S., Hati, S., 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54, 171–179.

Surówka, K., Żmudziński, D., Fik, M., Macura, R., Łasocha, W., 2004. New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 225–234.

Thiele, C., Grassl, S., Gänzle, M., 2004. Gluten Hydrolysis and Depolymerization during Sourdough Fermentation. *J. Agric. Food Chem*. 52, 1307–1314

Webb, K.E., 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. J. Anim. Sci. 68, 3011–3022.

Zayas, J. F., (1997). Solubility of Proteins. In J. F. Zayas (Ed.), Functionality of Proteins in Food (pp. 6-75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Zhang, J.-H., Tatsumi, E., Ding, C.-H., Li, L.-T., 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chem.* 98, 551–557.

Zotta, T., Piraino, P., Ricciardi, A., McSweeney, P.L.H., Parente, E., 2006. Proteolysis in model sourdough fermentations. *J. Agric. Food Chem*. 54, 2567–2574.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 555-568

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 5، آذر - دی 1399، ص. 568-555

The effect of wheat flour substitution with soy protein derivatives on the increase in angiotensin converting enzyme inhibitory activity of dough bioactive peptides

R. Bataghva[1], M. Mehraban Sangatash[2*], A. Ehtiati[2]

Received: 2019.08.27
Accepted: 2019.12.09

Introduction: Hypertension is the result of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in the vessel wall membrane. This enzyme converts angiotensin I to angiotensin II which results in vessel wall stiffness and an increase in blood pressure. Inhibition of ACE activity is a therapy for hypertension. In addition to synthetic inhibitors, some bioactive peptides (which are the products of protein proteolysis) have been identified as ACE inhibitors. Bread is a widely consumed bakery product all over the world. During dough fermentation, yeast proteases hydrolyze wheat flour proteins to prepare amino acid for cell growth. Natural cereal proteases are considered to be the other sources of protease. Proteolysis produces peptides in dough, which are bake-stable and have physiological effects on human body. Soy protein is a valuable plant protein, reported to be a source of peptides with ACE inhibitory activity and can be used to induce diversity in peptide species during dough fermentation. In this study, a completely randomized factorial design was created to evaluate the effect of the type of soy protein derivative, wheat flour substitution level and fermentation time on the ACE inhibitory activity of dough bioactive peptides.

Materials and Methods: Wheat flour was substituted with 3 soy protein derivatives, including soy protein isolate, extruded soy protein and soy protein hydrolysate at 5 and 10%. Moreover, fermentation time was adjusted at 30, 60 and 90 min. Dough aqueous extract was evaluated in terms of molecular weight distribution using SDS-PAGE technique. The extract was then filtered through 3KDa membrane to separate short-chain peptides (theoretically <30 amino acids). Peptide concentration was determined using UV absorbance difference. The peptide solution was tested for the degree of hydrolysis based on OPA complexation reaction and ACE inhibition activity using FAPGG as the reaction substrate at two peptide concentrations. The experiments were triplicated and data were analyzed by ANOVA and Fisher`s mean comparison test using MINITAB software.

Results and Discussion: Based on the SDS-PAGE pattern, it was observed that samples had a high level of low molecular weight peptides fraction were those enhanced with extruded soy proteins and soy protein hydrolysate. This results indicated that the addition of soy protein derivatives led to a higher content of short-chain peptides compared with wheat dough. The results also showed that all the examined variables, i.e. the type of protein, substitution degree and fermentation time, significantly affected the degree of hydrolysis and ACE inhibition activity of the separated peptides. The maximum degree of hydrolysis was observed in samples with soy protein hydrolysate- which was expected to have greater peptides diversity. This might be the reason for the higher ACE inhibition activity observed for these samples. Addition of Soy protein extrudate resulted in a higher degree of hydrolysis compared with soy protein isolate revealing that the extrusion technique caused to increase the protein susceptibility to proteolysis during fermentation along with the higher content of broken amino acid chains. The higher wheat flour substitution level resulted in a higher degree of hydrolysis, while in the case of ACE inhibitory activity, it was not significant. Overall, longer fermentation time increase the degree of hydrolysis, but led to lower ACE inhibition activity, probably due to active peptides hydrolysis. Wheat flour itself had a high level of ACE inhibition activity at the shortest fermentation time, compared with composite flours, while this activity was reduced at extended fermentation time. IC_{50} was the highest for the samples containing soy protein hydrolysate, surely a benefit from the initial proteolysis. In conclusion, the wheat flour substitution with 5% soy protein hydrolysate substitution,would lead to reasonable ACE inhibition activity and is suggested for bread formulation with hypertension lowering effect. It also needs more research to be done in order to evaluate substitution degrees lower than 5%, because it was observed that peptides diversity was more important than high hydrolysis degree. Overall, soy protein extrusion enhanced proteolysis and short-chain peptides production during fermentation which is a better option compared with isolated soy protein.

Keywords: Angiotensin Converting Enzyme, Bread, hydrolysate, Soy protein extrudate, Soy protein isolate

1 Department of Food Science and Technology, ACECR Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.
2 Department of Food Quality and Safety, Food Science and Technology Research Institute, ACECR Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
(* Corresponding Author: mehraban@acecr.ac.ir)